



TITLE:

Studies on the membrane lipid-mediated sensing and regulation of intracellular temperature( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Murakami, Akira

---

CITATION:

Murakami, Akira. Studies on the membrane lipid-mediated sensing and regulation of intracellular temperature. 京都大学, 2020, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22472>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要旨は2020-03-31に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	村上 光
論文題目	Studies on the membrane lipid-mediated sensing and regulation of intracellular temperature (膜脂質を介する細胞内温度の感知及び制御に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞内の温度は、様々な細胞機能に直接的に影響を与える。従って、細胞外の温度変化に対して細胞内の温度を細胞自律的に維持する機構は、細胞機能の恒常性の維持に必須であると考えられる。しかしながら、細胞が如何にして細胞内の温度変化を感知し制御しているのか、詳細な分子機構は不明である。細胞自律的な温度適応機構として、膜脂質の制御機構が古くから知られている。本論文では、ショウジョウバエ培養細胞をモデルとし、膜脂質の制御機構と細胞内温度の感知及び制御機構との関連について研究を進めた。本論文はその研究成果をまとめたものであり、序論および本論（三章）から構成される。以下にその概略を示す。</p> <p>序論では、生体膜の主要な構成要素であるリン脂質、リン脂質の脂肪酸組成を制御する脂肪酸不飽和化酵素及びその発現制御機構に関する先行研究、細胞内温度計測法、細胞内の主要な熱産生機構機構について記述し、本論文の目的が述べられている。</p> <p>第一章では、脂肪酸不飽和化酵素の発現制御に関する研究について記述されている。脂肪酸不飽和化酵素は、生体膜の物性を制御することにより温度変化への適応に貢献する。しかし、細胞が如何にして温度変化や生体膜の物性の変化を感知して脂肪酸不飽和化酵素の発現を制御するのか、詳細な分子機構は明らかではない。そこで、ショウジョウバエ培養細胞 S2 の唯一の脂肪酸不飽和化酵素である DESAT1 の発現制御機構を解析した。本研究により、DESAT1 タンパク質の分解が細胞内の不飽和脂肪酸含量の変化に応答して制御されることが明らかとなった。また、DESAT1 の 2 番目と 3 番目の連続するプロリン残基が、DESAT1 タンパク質の分解制御に必須であることを突き止めた。N 末端から 2 番目と 3 番目のアミノ酸残基がそれぞれプロリンとアラニンであるマウスの脂肪酸不飽和化酵素 SCD1 は、S2 細胞において細胞内の不飽和脂肪酸の含量の変化に応答した分解制御を受けなかった。しかし、SCD1 の 3 番目のアラニン残基をプロリン残基に置換した変異体は、この分解制御を受けた。これらの結果から、DESAT1 の N 末端の連続する 2 つのプロリン残基を”di-proline motif”と命名した。また、細胞内の主要なタンパク質分解経路の阻害剤や RNA 干渉実験により、Ca<sup>2+</sup>要求性プロテアーゼであるカルパインが di-proline motif に依存した DESAT1 タンパク質の分解機構に関与することを明らかにした。本章の研究により明らかとなった DESAT1 の発現制御機構はリン脂質の不飽和脂肪酸の含量を認識していると考えられる。本発現制御機構に関与する分子群の同定や機能解析により、細胞が生体膜の流動性を認識する機構、さらには生体膜の流動性に変化を介して温度変化を感知する機構が明らかとなることが期待される。</p> <p>第二章では、脂肪酸不飽和化酵素による細胞内温度制御に関する研究について記述されている。近年、1 細胞内の温度が可視化され、細胞内の温度が細胞外の温度とは異なることや、細胞内エネルギー代謝の活性の変化が 1 細胞レベルの温度変化を引き起こし得ることが明らかとなりつつある。細胞機能の恒常性を維持するためには、細胞内温度を維持する機構が必要であると想定される。しかしながら、そのような機構に関する知見は殆ど無い。一方、細胞や細胞内小器官を構成する生体膜の物性の制御機構は、膜タンパク質の制御といった様々な細胞機能の恒常性の維持に関与することが知られている。そこで、生体膜の物性制御と細胞内温度の制御との関連について解析を行った。本研究では、脂肪酸不飽和化酵素を DESAT1 しか有さないショウジョウバエ S2 細胞を用い、生体膜の物性制御に</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	村上 光
<p>重要である脂肪酸不飽和化酵素が細胞内温度の制御に関与するか検証した。先ず、蛍光性ポリマー温度センサーFPT（Hayashi et al. <i>PLoS ONE</i> 2015）により細胞内温度の解析を行ったところ、<i>Desat1</i> 遺伝子の破壊及び DESAT1 の特異的阻害剤により定常時の細胞内温度が約 2.5℃低下することを見出した。また、細胞内小器官での発熱に DESAT1 が影響を与えていると考え、細胞内小器官局在型の蛍光性タンパク質温度センサーtsGFP (Kiyonaka et al. <i>Nat methods</i> 2013)により細胞内局所の温度を解析したところ、DESAT1 の阻害によりミトコンドリアの温度が顕著に低下することを突き止めた。そこで、DESAT1 によるミトコンドリアのエネルギー代謝機能の制御機構に関して解析を行った。先ず、DESAT1 の阻害により ATP 合成と共役したミトコンドリア呼吸鎖の活性、及びミトコンドリア膜電位が低下することを見出した。また、これらの原因として、DESAT1 の阻害がミトコンドリア F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase の複合体形成異常や活性の低下を引き起こすことを明らかにした。これらの結果から、DESAT1 がミトコンドリア呼吸の活性制御を介して細胞内温度を高く維持する機構が強く示唆された。さらに、リン脂質の脂肪酸組成により制御されるタンパク質分子として、F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase を同定した。本章の研究により明らかとなった機構は広い細胞種において普遍的に発現するタンパク質分子群により担われることから、この“膜脂質を介する細胞内温度の制御”は普遍的かつ必須の機構である可能性が考えられる。</p> <p>第三章では、脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 を介した細胞内温度維持機構の生理学的意義に関する研究について記述されている。第二章における発見を基に、「DESAT1 は生体膜の物性の制御のみならず、細胞内温度の制御によっても温度変化への適応に寄与する」と仮説を立て、低温環境における DESAT1 によるミトコンドリア機能の制御を検証した。先ず、S2 細胞を通常培養温度（25℃）よりも 10℃低い 15℃環境に 4 時間暴露すると、DESAT1 依存的にミトコンドリア膜電位が顕著に上昇することを見出した。さらにこの際、DESAT1 依存的に F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase の複合体形成が促進し活性が高い状態となることが明らかとなった。また、この低温暴露の際には S2 細胞のリン脂質において DESAT1 の産物である一価不飽和脂肪酸が有意に上昇したことから、低温暴露時における DESAT1 のリン脂質の脂肪酸組成の調節がミトコンドリア機能の亢進に重要であることが示唆された。さらに、DESAT1 がミトコンドリア機能を制御する機構をより詳細に解析するために、S2 細胞の細胞内小器官を分画したところ、小胞体に局在するとされる DESAT1 が小胞体画分のみならず粗ミトコンドリア画分にも強く検出されることを発見した。また、細胞内局在の観察によっても DESAT1 はミトコンドリアに近接した局在を示すことを見出した。これらの結果から、低温暴露時に対して DESAT1 による F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase の制御依存的にミトコンドリア呼吸が亢進することが示された。さらに、DESAT1 は小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイトに局在することによりミトコンドリアに効率よく不飽和脂肪酸を供給し、ミトコンドリア機能に強く影響を与えている可能性を見出した。</p> <p>DESAT1 によるミトコンドリア機能制御は S2 細胞の細胞内温度に強く影響を与えることから、本論文から「低温暴露に対して細胞内温度の低下を抑制する機構が存在し、膜脂質の制御がこの機構に重要である」というモデルが想定された。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、生体膜脂質の制御に重要な脂肪酸不飽和化酵素を DESAT1 しか有さないショウジョウバエ培養細胞を研究題材とし、膜脂質を介する細胞内温度の感知及び制御機構の解明を目標とした研究であり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 脂肪酸不飽和化酵素は、温度変化に応答した生体膜の物性の制御に重要である。脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 の発現が生体膜の流動性の変化に応答したタンパク質分解により制御されていること、さらにその分子機構を明らかにした。本研究により明らかとなった DESAT1 の発現制御機構に関与する分子群は、生体膜の物性及び温度の変化の感知に関与することが期待される。
2. 脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 が細胞内温度の維持に関与すること、また、DESAT1 が  $F_1F_0$ -ATPase (ATP 合成酵素) の構造及び機能の制御を介してミトコンドリアの温度を制御することを明らかにした。
3. ショウジョウバエ培養細胞において、ミトコンドリアのエネルギー代謝機能が低温暴露に速やかに応答して亢進する機構が存在すること、この機構に DESAT1 が強く関与することを明らかにした。本研究から、「低温暴露に対して細胞内温度の低下を抑制する機構が存在し、膜脂質の制御がこの機構に重要である」というモデルが提唱された。

以上のように、本論文は細胞内温度が制御される機構、及びその生物学的意義に関する基盤的知見を著しく向上させたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 令和2年 3月31日以降